

ESTUDIO MORFOLOGICO Y PRUEBAS DE PATOGENICIDAD DE VARIAS
CEPAS DE CERATOCYSTIS FIMBRIATA ELL. & HALST.

Por

Cristóbal Barba Donoso

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA
Centro Tropical de Investigación y Enseñanza para Graduados
Turrialba, Costa Rica

Noviembre, 1961

ESTUDIO MORFOLOGICO Y PRUEBAS DE PATOGENICIDAD DE VARIAS
CEPAS DE CERATOCYSTIS FIMBRIATA ELL. & HALST.

Tesis

Sometida al Consejo de Estudios Graduados
como requisito parcial para optar al grado

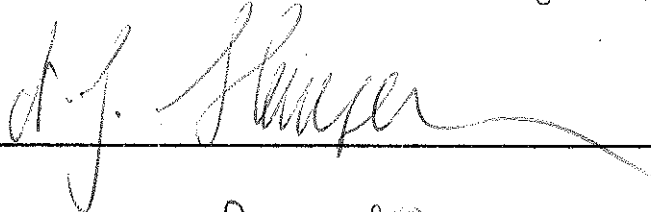
de

Magister Agriculturae

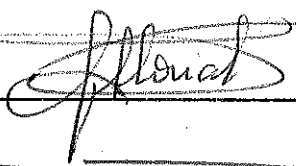
en el

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA

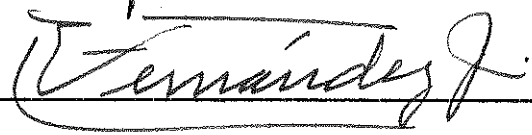
APROBADA:



Consejero



Comité



Comité

Comité

Noviembre, 1961

A mis queridos padres

AGRADECIMIENTOS

El autor desea expresar sus sinceros agradecimientos a los miembros de su Comité Consejero Dres. Gordon Havord, Eddie Echandi y Jorge Scria por su asesoramiento y en forma especial a su Consejero Principal Dr. Anton Jürgen Hansen, bajo cuya dirección se llevó a cabo el presente trabajo.

Al "American Cacao Research Institute" (ACRI) por haberle brindado la oportunidad de realizar estudios posgraduados.

A los Dres. H. L. Barnett, University of West Virginia, W. V.; E. M. Hildebrand, Agricultural Research Service, Beltsville, Maryland; Gino Malaguti, Instituto Nacional de Agricultura, Maracay, Venezuela; W. J. Martin, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana; y a los Ings. Enrique Ampuero, Estación Experimental Agrícola Tropical, Pichilingue, Ecuador; Ovidio Barros, Subjefe de la Campaña Nacional de Cacao, Palmira, Colombia y E. E. Trujillo, University of California, Berkeley, por haberle proporcionado las cepas del hongo necesarias para mi trabajo.

A aquellos miembros del personal del Instituto que prestaron su gentil colaboración durante la realización del presente trabajo.

BIOGRAFIA

El autor nació en la ciudad de Quito, Ecuador, en el año de 1928.

Realizó sus estudios primarios en su ciudad natal en el Pensio-
nado La Salle, los Secundarios en el Colegio San Gabriel de los PP.
Jesuitas y sus Universitarios en la Facultad de Ingeniería Agronómica
y Medicina Veterinaria de la Universidad Central del Ecuador en Quito.

Ingresó al Instituto Interamericano de Ciencias Agrícola en
Abril de 1960 para realizar estudios posgraduados, mediante una beca
del "American Cacao Research Institute", egresando en Noviembre de
1961.

TABLA DE CONTENIDO

	<u>Página</u>
INTRODUCCION	1
REVISION DE LITERATURA	2
MATERIALES Y METODOS	13
RESULTADOS	19
DISCUSION	30
CONCLUSIONES	35
RESUMEN	37
SUMMARY	39
LITERATURA CITADA	41
APENDICE	43

INTRODUCCION

En muchos países se conocen las enfermedades producidas por el hongo Ceratocystis fimbriata Ellis & Halsted, el cual ataca a varias especies vegetales, causando enormes perjuicios económicos mediante la disminución de la producción o la muerte de las plantas.

Entre las principales especies vegetales de importancia económica atacadas por el hongo se halla el Cacao (Theobroma cacao L.), Café arabigo (Coffea arabica L.), Camote (Ipomea batatas Poir), y Hule (Hevea brasiliensis Muell-Arg.). Este hecho movió a realizar el presente estudio cuyos objetivos principales fueron:

1. Estudiar la morfología y patogenicidad de varias cepas del hongo provenientes de Cacao, Café y Camote, originarias de varios países.
2. Encontrar posibles diferencias entre las cepas, en base a la morfología y a la reacción provocada en los diferentes hospederos.
3. Observar la producción de sustancias tóxicas por parte del hongo y estudiar su efecto en plantitas de Cacao, Café, Tomate, y ramillas de Camote.

El trabajo se realizó de Diciembre de 1960 a Octubre de 1961 en los laboratorios y campos del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, excepto uno de los experimentos que se realizó en la Finca La Lola, del Instituto, situada en la Costa Atlántica de Costa Rica.

REVISION DE LITERATURA

Organismo Causal

El hongo materia del presente estudio, pertenece a la clase de Ascomicetos, subclase Pirenomicetos, orden Sferiales, familia Ceratostomatacea u Ofiostomataceae y al género Ceratocystis descrito por Halsted y Fairchild en 1891 (13), quienes tomaron como especie tipo del género a Ceratocystis fimbriata. En la descripción original los autores confundían a los peritecios y ascosporas producidas en ascos evanescentes con picnidios y conidias.

Hunt (14) informa que Saccardo, basándose en el supuesto estado picnidial, lo transfirió al género Sphaeronaema (1892) y Elliot (1923) estableció que el picnidio de S. fimbriatum era en realidad un peritecio, transfiriéndole al género Ceratostomella. Posteriormente fue transferido a Ophiostoma por Nannfeldt (1934) y a Endoconidiophora por Davidson (1935).

Bakshi (3), a base de la evanescencia de las ascas, que poseen esporas unicelulares arregladas irregularmente en una masa mucilaginoso, lo restableció nuevamente en el género Ceratocystis.

Sinónimos

Varios investigadores han estudiado la morfología del hongo Ceratocystis fimbriata Ellis & Halsted, cuyos sinónimos son: (4, 7, 16).

Sphaeronema fimbriatum (Ell. & Halst.) Saccardo, 1892

Ceratostomella fimbriata (Ell. & Halst.) Elliot, 1923

Ophiostoma fimbriatum (Ell. & Halst.) Nannfeldt 1934

Endoconidiophora fimbriatum (Ell. & Halst.) Davidson, 1935

Rostrella coffeae Zimmermann, 1900

Ophiostoma coffeae (Zimm.) von Arx. 1952

Ceratocystis moniliformis (Hedgc.) C. Moreau, (7)

Descripción

Colonias: Las colonias al principio tienen una apariencia algodonosa, suelta, a los 2 o 3 días se vuelven pardo oscuras y finalmente se tornan pardo oliváceas y bajo la superficie del agar su color es oscuro. Las hifas aéreas son de hialinas a pardo claras, ramificadas, de pared delgada, septadas y casi todas terminan en endoconidioforos; su crecimiento es intermedio con un fuerte olor a aceite de banano o semejante a fruta (16).

Peritecios: Los peritecios son superficiales o sumergidos, de color pardo oscuro a negro, globosos con el cuello largo, sin hifas unidas diferenciadas. El cuello es negro, delgado, erecto, terminando en un ostiolo en el cual se encuentran las fimbrias ostiolares, que son hialinas, delgadas y terminan en punta. Andrus (1) señala como característica notable la temprana desintegración de las paredes de las ascas y la presencia de las ascosporas, con forma de sombrero en envolturas gelatinosas.

Endoconidioforos: Son pardo claros, hialinos en su extremidad, septados, de pared delgada, adelgazándose hacia la punta. Producen dos tipos de endoconidias: unas hialinas, cilíndricas, truncadas en los extremos y otras de color café claro o pardo oliváceo, de forma de barril o sub-globosas, de pared lisa o áspera (16).

Enfermedad

Ceratocystis fimbriata es el organismo causal de varias enfermedades, entre las cuales se encuentran el "mal del machete" o

Ceratostomella del cacao, el "Cáncer" o "Kanker" "Llaga macana del café", la "Podredumbre negra" o "Black rot" del camote. Se ha informado que varias especies vegetales son atacadas por C. fimbriata, mereciendo citarse principalmente:

STERCULIACEAE

Theobroma cacao (L) Cacao (2)

RUBIACEAE

Coffea arabica (L) Café arabigo (6)

LEGUMINOSAE

Caesalpinaceae

Cajanus indicus (Spreng.) gandul (14)

Cassia fistula (L) caña fístula (14)

Papilionaceae

Crotalaria retusa (L) crotalaria (14)

Crotalaria juncea (L) crotalaria (22)

EUPHORBIACEAE

Hevea brasiliensis (Muell.-Arg.) hule (22)

PLATANACEAE

Platanus occidentalis (L) árbol de platano (20)

Platanus orientalis (L) árbol de platano (20)

Platanus acerifolia (Willd.) árbol de platano (20)

CONVOLVULACEAE

Ipomea batatas (Poir.) camote (15)

ARACEAE

Colocasia sculenta (Schott) taro (16)

Xanthosoma sagittifolium (Schott) malanga (16)

ANACARDIACEAE

Mangifera indica (L)

mango

(30)

Los síntomas de la enfermedad en cacao, café y camote se presentan en las formas siguientes:

Cacao:

Arbelaez (2) describe los síntomas en la siguiente forma: "La enfermedad se manifiesta primero por un marchitamiento de las hojas, que se inicia en las ramas superiores y luego avanza hacia abajo paulatinamente, hasta abarcar todo el follaje que está por encima de la lesión del tronco o ramas. Las hojas toman primero un color amarillento y luego pardo rojizo o carmelita al secarse, permaneciendo adheridas a las ramas sin que ocurra el "paloteo", como en el caso de la "llaga macana" del cafeto".

Café:

Bianchini (5) describe los síntomas en el café diciendo: "Las plantas severamente atacadas por el hongo resaltan por su follaje marchito, escaso y amarillento, y con frecuencia presentan una coloración rojiza. Las ramas se muestran total o parcialmente desprovistas de hojas, llegando a morir. Los frutos son de tamaño anormal y presentan clorosis prematura. Al remover la corteza cerca de la base del tronco o ramas afectadas, se encuentran lesiones típicas de color pardo rojizo o negras superficiales ya que no penetran muy profundo en la madera. Las plantas pueden morir más o menos rápidamente o durar por tres o cuatro años".

Camote:

Halsted y Fairchild (15) indican que "El síntoma más notorio de la enfermedad y que lo distingue de otras enfermedades, es que se produce en los tubérculos mismos, consistiendo en la presencia de puntos oscuros, que varían de 1/4 a 4 pulgadas de diámetro, algunas veces cubriendo la parte más grande del tubérculo y extendiéndose por dentro del tejido. Estos puntos no pueden confundirse, ya que son manchas aisladas, hundidas con definidos márgenes, como manchas con un tinte metálico cuando salen a la parte no dañada. En los brotes la enfermedad se manifiesta mediante líneas oscuras, negras, sobre la parte inferior de los vástagos, algunas veces en la parte más baja de las hojas, apareciendo también en porciones aisladas del tallo. Algunas veces la punta de los brotes marchita y muere".

Diferentes autores han afirmado que las cepas del hongo son indiferenciables morfológicamente, en cualesquiera de los hospederos (12, 20, 21, 22, 28).

Malaguti (18, 20) estudió la cepa del hongo procedente de cacao y encontró que era morfológicamente indiferenciable de las aisladas de café, camote y crotalaria, concordando según el autor con las descripciones de Pontis y Saccardo. También señala más tarde (21) que en repiques, el hongo da lugar a modificaciones morfológicas muy marcadas en la colonia, cambiando de color del gris oscuro a blanquecino, de adherente al medio a algodonoso y de abundante productor de peritecios a escaso productor de endoconidias.

Martin (23) describió la cepa encontrada en café como muy similar morfológicamente a C. fimbriata de camote, pero aparentemente

diferente genéticamente, en base a su patogenicidad y a la esterilidad que presentan las ascosporas de peritecios formados por el apareamiento de razas autoestériles. En otro trabajo (24) el mismo autor encontró con cepas provenientes de hule que el organismo causal era indistinguible morfológicamente de C. fimbriata Ell. & Halst., aunque observó variaciones en cuanto a las características de las colonias. Igualmente Castaño (6) al trabajar con cepas provenientes de café encontró que dentro de una misma colonia suelen ocurrir con facilidad mutaciones del hongo.

Pontis (28) señaló que los estudios taxonómicos mostraban que el Ceratostomella aislado de café era morfológicamente similar a C. fimbriata Ell. & Halst. y por esto propone la asignación del patógeno de café a esta especie.

Viegas (30) coincidió con las descripciones de otros autores al estudiar una cepa aislada de Mangifera indica.

A continuación se indican las dimensiones informadas por diferentes autores de observaciones hechas sobre cepas provenientes de diferentes hospederos, para el cuerpo y cuello de los peritecios, endoconidias hialinas, endoconidias oscuras y ascosporas.

CUADRO 1. Medidas en micrones de las diferentes partes del peritecio y endoconidias, en cepas provenientes de diferentes hospederos.

Peritecios			
Hospedero	Cuerpo	Cuello	Número fimbrias
Crotalaria (7)	162-192 x 184-203	588-622 x 22-26	12-14
Crotalaria (9)	112-240	224-832	
Café (28)	103-150	hasta 1500	
Medio de Lab. (16)	130-200	800 x 20-35	8-15
Café (6)	80-230	500-600 x 20-30	
<u>Crotalaria retusa y</u> <u>Cassia fistula</u> (14)	90-270	500-700	

Endoconidias		
Hospedero	Hialinas	Oscuras
Crotalaria (7)	18.8 x 4.5	9.4-15.9 x 9.3-13.0
Crotalaria (9)	35-108 x 4-6	11.5-16 x 9-12
Café (6)	10-40 x 4-6	12.0-20.0 x 8-12
Café (28)	9.5-49.2	10.5-18.5 x 7.7-10.3
Cacao (2)	15-40 x 4-6	
Mango (30)	35-108 x 4-6	8-12 x 4-5
Medio de Lab. (16)	11-16 x 4-5	11-16 x 4-5
<u>Cassia fistula y</u> <u>Crotalaria retusa</u> (14)	8-18 x 1.5-3	8-15 x 8-13

Ascosporas	
Hospedero	
Crotalaria (7)	6.5-8.6 x 3.6-5
Crotalaria (9)	3.5-5.6 x 3.2-4.8

Hospedero

Café arabigo (28)	4.7-7 x 3.2-4.8
Café (6)	4.0-7 x 3.0-5
Camote (7)	5.0-9
Hule (7)	4.5-8.7 x 3.5-4.7
Cacao (2)	4.7 x 3.0-4
Medio de Lab. (16)	4.5-8 x 2.5-5.5
<u>Crotalaria retusa</u> y <u>Cassia fistula</u> (14)	3.5-5 x 2.0-3.5

Patogenicidad

Los diferentes autores no están de acuerdo sobre la patogenicidad de C. fimbriata; Arbelaez (2) cree que Ophiostoma fimbriatum (Ceratocystis fimbriata), puede atacar indistintamente plantas de cacao, café y camote.

Malaguti (22) informó que inoculando plantitas de crotalaria (C. juncea), con cepas del hongo provenientes de crotalaria, café (C. arabica) y de camote (Ipomea batatas), las de café y crotalaria no tuvieron diferencia en cuanto a su patogenicidad, ya que a los trece días 50 plantitas inoculadas se hallaban muertas, mientras que con la cepa de camote solamente se encontraban 12 plantitas muertas. De las tres cepas inoculadas en tubérculos de camote, la de camote fue la más virulenta, la de crotalaria lo fue medianamente, y la de café escasamente virulenta. Al inocular plantas de café el mismo autor encontró que solo era patógena la procedente del mismo hospedero, más no las de crotalaria y camote. También indica que con una cepa

aislada de cacao encontró resultado positivo en crotalaria y café.

En otro trabajo Malaguti (21) señaló que en pruebas de inoculación cruzada entre cepas de cacao, café y plátano, las cepas de cacao eran similares entre sí, que la de café causó una reacción casi semejante y que la de plátano difería sensiblemente de la de cacao en poder patógeno. Como plantas hospederas usó plantitas de 12 a 18 meses y árboles adultos de cacao.

Viegas (30) encontró que C. fimbriata, aislado de Mangifera indica era patógena a Crotalaria juncea pues las plantitas inoculadas se marchitaron a los 6 días y se secaron a los 8, mientras que en el café el hongo se manifestó ligeramente patógeno.

Pontis (28) tratando de inducir el cáncer del café con cepas de C. fimbriata de camote, con Thielaviopsis paradoxa y C. pilifera, no tuvo resultado satisfactorio, pero sí lo obtuvo con la cepa aislada de café.

Martin (24), empleando una cepa aislada de hule, no pudo reproducir en camote la podredumbre negra. El mismo autor halló más tarde (23) al usar cepas procedentes de café y camote, que la de café no causaba podredumbre negra en camote y que la de camote tampoco ocasionaba daños en la corteza de plantitas de café.

Idrobo y Cardeñosa (17) inocularon una cepa aislada de cacao en café y esta no fue patógena.

Mizukani (25), en el Japón, trabajando con una cepa aislada de camote e inoculada a Taro (Colocassia antioeorum), encontró que este hospedero es resistente a C. fimbriata.

Toxinas

Lilly y Barnett (19), afirman que el marchitamiento causado por hongos de los géneros Ceratostomella, Fusarium, Verticillium y Cephalosporium puede deberse a toxinas o a productos metabólicos que obstruyen los vasos más bien que a obstrucción mecánica producida por el excesivo crecimiento de micelio.

Zentmayer y Horsfall (32), y otros (8, 13, 31), investigaron la producción de toxinas en Ceratocystis ulmi. Extrajeron dos toxinas que actuaban sobre ramillas de tomate y olmo, produciendo la primera según Dimond (8) enrollamiento y marchitez del margen de la hoja sin causar necrosis, mientras que la segunda producía fuerte necrosis, tanto en tomate como en olmo.

Feldman (13) y Zentmayer (31, 32), inyectaron las toxinas en olmos y encontraron que estas eran capaces de reproducir la enfermedad holandesa en los olmos.

Naundorff e Idrobo (26) trataron de probar la producción de toxinas de C. fimbriata en plantas de cacao, creyendo que éstas podrían ser una posible causa de la muerte rápida de los árboles de cacao. Ellos usaron extractos de material infectado (madera y corteza); y encontraron que las hojas y plantas de tomate empleadas como indicadores de la presencia de toxinas comenzaban a marchitarse a las 12 horas y morían a las 48 en extracto calentado y a las 60 en extracto sin calentar. Los testigos aún a las 84 horas se hallaban frescos.

CUADRO 2. Patogenicidad de C. fimbriata Ell. & Halst.

CEPAS	H O S P E D E R O S						
	CACAO	CAFE	CAMOTE	CROTALARIA	HULE	MANGO	ARBOL DE PLATANO
Cacao (2, 17, 22)	+	-	+	+			
Café (6, 21, 22, 24)	+	+	-	+			
Camote (15, 22, 28)		-	+	⊗			
Crotalaria (22)		-		+			
Hule (24)			-		+		
Mango (30)				+		+	
Arbol. de platanoc (21) ⊗							+

+ Resultados positivos.

- Resultados negativos.

⊗ Resultados dudosos.

MATERIALES Y METODOS

Estudio morfológico de las cepas

El estudio morfológico se realizó con cepas provenientes de cacao, café y camote, las cuales a su vez procedían de Colombia, Ecuador, Venezuela, Costa Rica y Estados Unidos de Norte América como se indica a continuación:

Hospedero	Procedencia
Cacao <u>Theobroma cacao</u> L.	Colombia Nº 1
Cacao	Ecuador 1659
Cacao	Venezuela Nº 560
Café <u>Coffea arabica</u> L.	Costa Rica, San José
Café	Costa Rica, Aquiares
Camote <u>Ipomea batatas</u> (Poir.)	U.S.A., California
Camote	U.S.A., Beltsville

Los cultivos monospóricos de las cepas se obtuvieron mediante la dilución de una suspensión de esporas, la cual se depositó en una caja de petri con agar-agua y luego se observó al microscopio, se marcó una endoconidia hialina y se la extrajo y sembró en agar papa dextrosa. Las colonias obtenidas se sembraron en el medio de cultivo sintético usado por Echandi y Echandi(10), compuesto de:

Glucosa	10.00 g
Asparagina	2.00 g
Fosfato básico de Potasio	1.00 g
Sulfato de Magnesio	0.50 g
Cloruro férrico	0.01 g
Cloruro de Zinc	0.01 g

Agar "Difco"	20.00 g
Agua destilada hasta completar	1.000,00 ml.

Añadiendo al medio 1.0 g de clorhidrato de tiamina, que según los autores citados (10) y otros (18, 29) es necesaria para el desarrollo y la fructificación del hongo.

En el estudio morfológico se efectuaron las siguientes mediciones: diámetros del cuerpo de los peritecios; largo del cuello, diámetro del mismo tanto en la base como en la punta y número de fimbrias ostiolarres.

Las mediciones de las ascosporas, endoconidias hialinas y endoconidias pardas u oscuras se hicieron tomando los diámetros mayores y menores.

Se tomaron 100 medidas en cada caso y los resultados fueron analizados estadísticamente utilizando los datos no transformados de las mediciones hechas con un microscopio Zeiss Junior.

Para las medidas de diámetros del cuerpo del peritecio, diámetros de la base y de la punta del cuello y su largo se usó un aumento de 80x; para las medidas de endoconidias hialinas y oscuras, y ascosporas el aumento usado fue de 320 x. Los factores de transformación fueron en el primer caso $F = 14.2$ y en el segundo $F = 3.57$.

Pruebas de Patogenicidad

Para estudiar la patogenicidad de las diferentes cepas se planearon varios experimentos en el campo usando plantas jóvenes y adultas de café y cacao.

1. Prueba en cacao adulto.

Para la prueba se escogieron tres cepas del hongo, provenientes de tres hospederos:

Cacao	Ecuador Nº 1659
Café	Costa Rica, San José
Camote	U.S.A., California

Las cepas se escogieron tomando en cuenta la abundancia de crecimiento del micelio en el laboratorio, y la producción de peritecios. Como planta hospedera se emplearon árboles de semillas de 4 a 5 años de edad del clon UF-221, establecidos en la Estación Experimental La Hulera, Turrialba.

Como diseño experimental se usó un bloque al azar con tres tratamientos y 8 repeticiones, empleándose en cada parcela 12 árboles. La inoculación se hizo aplicando una suspensión de esporas en una herida practicada en el tronco de cada planta; la herida fue luego recubierta con algodón y cinta adhesiva, permaneciendo aquel perfectamente humedecido.

2. Prueba en café adulto.

Para esta prueba se escogieron las mismas cepas del experimento anterior, usándose el mismo diseño y método de inoculación; en árboles de Coffea arabica de 9 años establecidos en la sección denominada "Ensayos culturales de Café" del Instituto.

3. Prueba con plantitas jóvenes de cacao y café.

En esta prueba se emplearon como hospederos plantitas de semilla de Coffea arabica c.v. 'Bourbon', c.v. 'Salvadoreño' y plantitas de semilla de Theobroma cacao UF-221 de 6 a 8 meses de edad.

El diseño empleado fue bloques al azar en factorial 5 x 2 con 8 repeticiones y con parcelas de doce individuos. Las cepas empleadas fueron:

Cacao	Ecuador N ^o 1659
Cacao	Venezuela N ^o 560
Café	Costa Rica, San José
Camote	U.S.A., California

Como testigo se empleó agua destilada esterilizada, usándose para la inoculación el mismo método empleado en los experimentos anteriores.

4. Prueba en árboles de cacao de más de 40 años.

Esta prueba se realizó en la finca La Lola para estudiar el comportamiento patogénico de 6 cepas aisladas de cacao e inoculadas en árboles de la misma especie.

Las cepas de cacao empleadas en esta prueba fueron:

Colombia N^o 1

Colombia N^o 2

Ecuador N^o 1658

Ecuador N^o 1659

Venezuela N^o 556

Venezuela N^o 560

Como diseño se empleó un bloque al azar con 6 tratamientos y 12 repeticiones, empleándose un árbol por tratamiento. Para la inoculación se emplearon trocitos de micelio, los que fueron depositados en una herida practicada en el tronco del árbol y posteriormente recubierta con algodón y cinta adhesiva.

5. Segunda prueba en plantas jóvenes de cacao.

Este experimento se planeó en bloques al azar con 8 cepas de C. fimbriata y una cepa de C. moniliformis (Hedgc.) C. Moreau, utilizando como testigo agua destilada esterilizada. El cultivo de

C. moniliformis, tanto como las dos cepas de Costa Rica fueron obtenidos en aislamientos procedentes de plantas de cacao enfermas, durante los trabajos rutinarios de laboratorio. Se hicieron 5 repeticiones y en cada tratamiento se emplearon 10 plantitas de cacao de semilla de 6 a 8 meses de edad del clon UF-221.

Las cepas empleadas fueron:

Colombia N° 1
Colombia N° 2
Costa Rica, mazorca
Costa Rica, tronco
Costa Rica, C. moniliformis
Ecuador, N° 1658
Ecuador N° 1659
Venezuela N° 556
Venezuela N° 560

Pruebas de Toxicidad

Para realizar las pruebas de toxicidad primeramente se cultivó al hongo en el medio líquido recomendado por Feldman y otros (13), y se emplearon las siguientes cepas:

Cacao	Ecuador N° 1659
Café	Costa Rica, San José
Camote	U.S.A., California

Como testigos se usaron agua destilada y medio sin inocular, constituido por:

Glucosa	25.00 g
l-asparagina	2.00 g

KH ₂ PO ₄	1.50 g
Extracto de levadura	2.00 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.00 g
Fe Cl ₃	0.01 g

Agua destilada hasta completar 1.000 ml.

Se colocaron 50 ml. del medio en un matraz cónico y se esterilizó por 15 minutos a 15 libras de presión y luego se depositó una suspensión de esporas. Los cultivos fueron sometidos a agitación por 10 días, permaneciendo posteriormente otros 10 sin agitar. El líquido filtrado con celita se repartió en tubos de ensayo que contenían 10 ml. cada uno, en los que se puso como plantas indicadoras plantitas sin raíz de cacao y café de 6 a 8 meses de edad, plantitas de tomate de 45 días y ramillas de camote. Para la prueba se empleó un diseño de bloques al azar en factorial 4 x 5 con 4 repeticiones.

Una segunda prueba se realizó posteriormente, empleándose un extracto de mazorcas de cacao inoculadas con las cepas empleadas en la prueba anterior. Como testigos se empleó un extracto de mazorcas sin inocular y agua destilada. Plantitas de tomate sin raíz de 45 días de edad se depositaron en matraces cónicos en los que había repartido 50 ml. de los extractos inoculados y el testigo.

El diseño usado fue de bloques al azar empleándose 5 tratamientos con 4 plantas por parcela y 4 repeticiones.

RESULTADOS

Estudio morfológico

Colonias: El hongo crecía bien en el medio usado. Su color variaba desde el blanco hasta el pardo oliváceo. Las hifas eran pardo claras, cuando sumergidas se tornan oscuras. Su crecimiento era variable de acuerdo con la cepa y el hospedero de la cual se había aislado. Tenía un fuerte olor a fruta.

Peritecios: Los peritecios eran superficiales o sumergidos, su cuerpo era de pardo a negro, su cuello negro, delgado, hialino en la punta, erecto. En el ostiolo se encontraban las fimbrias que variaban en número desde 8 a 16 según la cepa. La producción de los peritecios comenzaba a los 2 o 3 días, excepto en una cepa que no los produce.

Endoconidioforos: Casi todas las hifas aéreas terminaban en endoconidioforos de color pardo claro, hialinos en la extremidad, septados, de pared delgada y adelgazados hacia la punta. Producían dos clases de endoconidias: unas hialinas, cilíndricas, truncadas en los extremos, las que comenzaban a producirse a las 48 horas, llegando en algunas cepas a las 72 y 96 horas; las otras, pardas u oscuras, se producían entre las 3 semanas, eran de forma de barril o subglobosas.

Ascosporas: Las ascosporas se producían en el peritecio, siendo expulsadas por el ostiolo; se hallaban recubiertas de una envoltura gelatinosa y tenían un borde en forma de sombrero. No se pueden distinguir las ascas dentro del peritecio.

Entre las cepas estudiadas se encontró que la de camote, originaria de Beltsville, U.S.A., presentaba como característica la falta de

producción de peritecios, razón por la cual no se pudieron verificar en ella las mediciones correspondientes.

Los resultados de las mediciones efectuadas para las diferentes partes del peritecio, endoconidias hialinas y oscuras, ascosporas y el contaje del número de fimbrias ostiolares se presentan en el Cuadro Nº 3, en forma de promedios y rangos.

El análisis de los datos obtenidos en dichas mediciones y contajes (Cuadros Nos. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, Apéndice) indica lo siguiente:

1. El diámetro vertical del cuerpo del peritecio de las cepas de cacao y café fue significativamente menor que los de las cepas de camote. El diámetro vertical en la cepa de cacao de Venezuela Nº 560 fue significativamente más pequeño que en las otras cepas de cacao estudiadas. No hubo diferencias significativas entre los diámetros verticales en las cepas de café.
2. No hubo diferencias significativas del diámetro horizontal del cuerpo del peritecio entre las cepas de café, pero en la cepa de cacao de Venezuela fue significativamente más pequeño que en las cepas de cacao de Ecuador y Colombia las cuales no fueron diferentes entre sí.

El diámetro horizontal en la cepa de camote fue significativamente mayor que en las cepas de café.

3. La longitud del cuello del peritecio de las cepas de cacao fue significativamente (1%) más grande que la de las de café, pero igual a la de la cepa de camote; sin embargo, las cepas de cacao de Ecuador y de Colombia tienen cuellos

CUADRO 3. Promedios y rangos en micrones de las diferentes partes del peritecio, endoconidias hialinas y oscuras, ascosporas y número de fimbrias de 6 cepas de C. fimbriata Ell. & Halst.

Cepas	Diámetro vertical cuerpo del peritecio		Diámetro horizontal cuerpo del peritecio		Longitud del cuello	
	\bar{x}	Rango	\bar{x}	Rango	\bar{x}	Rango
Cacao Ecuador Nº 1659	227	99-355	213	99-284	586	270- 923
Cacao Colombia Nº 1	212	85-355	202	85-284	569	128-1.562
Cacao Venezuela Nº 560	180	71-256	158	71-355	474	185- 724
Café Costa Rica, Aquiares	205	99-355	171	99-270	262	85- 611
Café Costa Rica, S. José	211	114-355	177	85-284	241	71- 497
Camote USA, California	257	114-355	245	142-355	551	355- 767
	Diámetro de la base cuello del peritecio		Diámetro de la punta cuello del peritecio		Largo de las endoconidias hialinas	
	\bar{x}	Rango	\bar{x}	Rango	\bar{x}	Rango
Cacao Ecuador Nº 1659	28	14-28	15	14-28	19	14-29
Cacao Colombia Nº 1	29	14-43	16	14-43	17	11-25
Cacao Venezuela Nº 560	24	14-43	18	14-43	22	11-46
Café Costa Rica, Aquiares	27	14-28	25	14-28	21	11-32
Café Costa Rica, S. José	26	14-28	22	14-28	20	11-29
Camote USA, California	32	28-43	17	14-28	17	11-25

Cepas	Ancho de las endoconidias hialinas		Largo de las endoconidias oscuras		Ancho de las endoconidias oscuras	
	\bar{x}	Rango	\bar{x}	Rango	\bar{x}	Rango
Cacao Ecuador No 1659	5	4-7	13	7-18	9	7-14
Cacao Colombia No 1	6	4-11	13	11-18	10	7-14
Cacao Venezuela No 560	5	4-11	13	7-18	10	7-14
Café Costa Rica, Aquiares	5	4-11	13	11-18	10	7-14
Café Costa Rica, S. José	5	4-7	13	11-18	11	7-14
Camote USA, California	5	4-11	13	11-18	10	7-11

Cepas	Largo de la base de las ascoporas		Número de imbricias ostiolares	
	\bar{x}	Rango	\bar{x}	Rango
Cacao Ecuador No 1659	7	4-7	10.34	8-13
Cacao Colombia No 1	6	4-7	8.93	8-14
Cacao Venezuela No 560	6	4-7	9.95	8-14
Café Costa Rica, Aquiares	7	4-7	9.99	8-16
Café Costa Rica, S. José	7	4-7	10.37	8-16
Camote USA, California	7	4-7	9.42	8-12

En este caso sólo se tomaron 63 medidas. Las medidas correspondientes a alto de las ascoporas dieron un valor constante de 3.57 para todas las cepas.

significativamente más grandes que aquellos de la cepa de Venezuela. También fueron significativamente (1%) diferentes entre sí los cuellos de las 2 cepas de café. Los cuellos de las cepas de café fueron significativamente (1%) más pequeños que los de la cepa de camote.

4. La base del cuello y el diámetro de la punta del cuello tuvieron diferencias altamente significativas entre todas las comparaciones posibles, lo cual indica que son caracteres extremadamente variables entre y dentro de las cepas de los diferentes hospederos.
5. El promedio de largo de las endoconidias hialinas de la cepa de café fue mayor en forma altamente significativa que el promedio de la de camote, pero no fue diferente del promedio de las cepas de cacao.

La cepa de cacao de Venezuela tuvo endoconidias significativamente (1%) más largas que las cepas de Colombia y Ecuador.
6. Las endoconidias hialinas de la cepa de cacao fueron más anchas en forma altamente significativa que las de las cepas de café y camote. No hubo diferencias estadísticas en anchura entre las cepas de cacao, ni en la comparación de las de café y camote, pero fueron significativamente (1%) diferentes entre sí las dimensiones de anchura de las endoconidias de las dos cepas de café de Costa Rica.
7. Las endoconidias oscuras tuvieron longitudes similares en todas las cepas.
8. El ancho de las endoconidias oscuras fue un carácter que varía en forma altamente significativa entre las cepas de

diferentes hospederos y del mismo hospedero. Una tendencia exactamente similar se encontró para el largo de las ascoporas y para el número de fimbrias ostiolares.

Patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad con las diferentes cepas muestran que la enfermedad se producía, tanto en plantas jóvenes, como en adultas de café y cacao.

1. Prueba en cacao adulto.

Pocas plantas murieron hasta 90 días después de la inoculación. Los síntomas empezaron a presentarse al mes y medio de haber inoculado las plantas; las hojas adquirían un color bronceado que comenzaba en el ápice y en los bordes extendiéndose rápidamente por toda la lámina. Cuando morían las hojas adquirían un color pardo y quedaban adheridas a las ramas.

En la zona de la herida, la corteza se presentaba deprimida y al descubrirla se advertía un color rojizo que en la madera se extendía preferentemente más hacia arriba que hacia abajo. Muchas veces existen puntos secundarios de infección en la parte situada arriba del punto de inoculación, que por lo general tienen un color café o castaño, presentándose a veces manchas lineales de color azul. Al reaíslar no siempre se encontró el hongo presente en estos puntos secundarios, pero sí se lo encontraba en la parte de madera de color rojizo y cerca del punto de inoculación.

Los datos de infección se recogieron mediante la siguiente escala arbitraria con valores de 1 a 4, de acuerdo con el progreso de la enfermedad:

- 1 = planta sana, con la herida completamente cicatrizada,
- 2 = planta enferma con un desarrollo de hasta 10 cm. de infección,
- 3 = planta enferma con más de 10 cm. de infección, y
- 4 = planta muerta.

Los valores obtenidos se presentan en el Cuadro Nº 12 del apéndice.

El análisis de la variación indicado en el Cuadro Nº 13 arroja diferencias altamente significativas tanto para cepas, como para repeticiones.

Mediante la prueba de intervalos múltiples y F múltiples de Duncan, se encontró que la cepa de café era significativamente menos patogénica que las de cacao y camote, pero no hubo diferencias entre las dos últimas.

$$S_m = 1.22$$

Cepas	Café	Cacao	Camote
Promedios	27.37	<u>32.50</u>	<u>34.75</u>

Los promedios unidos por una misma línea no difieren significativamente.

2. Prueba en café adulto.

Tampoco en café adulto llegó a producirse la muerte de las plantas, pero se desarrolló un típico cáncer de color pardo claro u oscuro a negro. El desarrollo de la lesión se generalizó más hacia abajo que hacia arriba, al contrario de lo que sucede en el cacao. El tejido más afectado es la corteza, ya que el hongo invade muy poco la madera en lo cual también se diferencia del proceso de infección en cacao.

Los resultados obtenidos mediante el uso de la misma escala que en cacao y el respectivo análisis de la variancia se encuentran en los Cuadros Nos. 14 y 15 del apéndice.

Por medio de la prueba de Duncan se estableció que la cepa de café fue significativamente más virulenta a café que las de cacao y camote. Las dos últimas no mostraron diferencias.

Cepas	Camote	Cacao	Café
Promedios	<u>22.62</u>	<u>22.87</u>	27.37

Los promedios unidos por la línea no difieren significativamente.

3. Prueba con plantitas jóvenes de cacao y de café.

En esta prueba se produjo la muerte de plantitas tanto de cacao, como de café por la acción del hongo, cuyas cepas se comportaron en forma diferente según el hospedero.

Los síntomas presentados por las plantitas de cacao variaban desde pequeños puntos cloróticos hasta una ligera clorosis intervenal en las hojas, las que se tornaban más tarde color pardo bronceado, muriendo posteriormente en forma igual a las plantas adultas de la misma especie. Otras presentaban directamente un síntoma similar al de las plantas adultas, o sea bronceamiento del margen de la hoja que se extendía rápidamente muriendo las plantitas en dos o tres días.

En las plantitas inoculadas con la cepa de cacao Ecuador 1659, los primeros síntomas se presentaron a los 10 días de la inoculación; en las plantitas inoculadas con la cepa de cacao de Venezuela 560 y con la cepa de café de Costa Rica, S. José a los 20 días y al mes en las plantitas inoculadas con la cepa de camote de California.

En las plantitas de café los síntomas empezaron a presentarse más tarde, pues sólo a las 6 semanas de la inoculación aparecieron los primeros síntomas en plantitas inoculadas con la cepa de café Costa Rica, S. José y la de cacao Venezuela 560. Los síntomas comenzaban por un amarillamiento o clorosis de las hojas las cuales adquieren más tarde un color bronceado, quedando al morir adheridas a las ramitas.

La lesión crecía preferentemente más hacia abajo del punto de inoculación en los cafetos y más hacia arriba en el cacao de la misma manera como se describió en los experimentos anteriores. Los testigos no presentaron ningún síntoma durante el tiempo de duración del experimento.

Los datos de infección presentados en el Cuadro Nº 16 del apéndice se recogieron utilizando valores arbitrarios de acuerdo con la escala siguiente:

- 1 = plantas sanas, sin síntomas de enfermedad, y
- 2 = plantas muertas

El análisis de la variación de los resultados presentados en el Cuadro Nº 16 del apéndice indica que las cepas de cacao, café y camote difirieron entre sí en forma altamente significativa en su infección a café y cacao. Las tres cepas produjeron síntomas en forma altamente significativa más rápidamente en cacao que en café. Las cepas de cacao de Ecuador y Venezuela dieron diferencias altamente significativas en su infección a café, siendo la de Venezuela la más patógena. Las cepas de café atacaron significativamente más a café que a cacao. Los testigos de agua destilada no infectaron a ningún hospedero.

4. Prueba de patogenicidad en árboles de cacao de más de 40 años.

Esta prueba se realizó en la Finca "La Lola" y a los dos meses fue necesario suspenderla por razones fitosanitarias. Se tomaron las superficies en centímetros cuadrados de las lesiones rojizas o castañas ocasionadas por el hongo; los datos se ofrecen en el Cuadro Nº 18 del apéndice. En ninguno de los árboles se presentaron los síntomas exteriores de la enfermedad.

El análisis de la variancia presentado en el Cuadro Nº 19 del apéndice indica que no había diferencias significativas en la acción de las cepas.

5. Segunda prueba con plantas jóvenes de cacao.

Esta prueba tuvo por objeto evaluar la patogenicidad de las cepas de cacao de Colombia, Ecuador y Venezuela para compararlas con cepas de Costa Rica y con una cepa de C. moniliformis. Los síntomas de la enfermedad fueron idénticos a los que mostraron las plantas jóvenes de cacao en el experimento Nº 3.

El período de incubación de la enfermedad desde la inoculación hasta la aparición de los primeros síntomas externamente visibles varía de 7 días a 30 de acuerdo a la cepa.

Para la evaluación de los resultados se usó la misma escala que en el experimento Nº 3.

El análisis y los resultados que se presentan en los Cuadros Nos. 20 y 21 del apéndice, arrojan diferencias altamente significativas. La aplicación de la prueba de Duncan indica que la cepa de Ecuador 1658 y la de Colombia N. 2 fueron en forma altamente significativa más patógenas sobre las plántulas de cacao que las otras cepas. Las

cepas de Costa Rica de la mazorca, la de Ecuador 1659 y la de Costa Rica del tronco no difirieron entre sí, pero infectaron en forma altamente significativa más que las cepas: Colombia N^o 1, Venezuela 560, C. moniliformis, Venezuela 556 y testigo.

Cepas	Testigo	Venezuela 556	<u>C. moniliformis</u>	Venezuela 560	Colombia N ^o 1	Costa Rica tronco	Ecuador 1659	Costa Rica mazorca	Ecuador 1658	Colombia N ^o 2
Promedios	10.00	13.00	<u>13.80</u>	<u>14.00</u>	15.00	<u>16.60</u>	<u>16.80</u>	<u>17.20</u>	18.20	19.00

$S_m = 0.273$

Los promedios unidos por una misma línea no difieren significativamente entre sí.

Toxicidad

Prueba N^o 1.

No se obtuvieron resultados satisfactorios, pues se presentó marchitamiento y muerte de las plantitas indicadoras de cacao, café y tomate y de las ramillas de camote tanto en el medio inoculado con las cepas, como en medio sin inocular que actuaba como un testigo. No presentaron ningún síntoma las plantitas y ramillas que se hallaban en el otro testigo, agua destilada.

Prueba N^o 2.

En esta prueba tampoco se obtuvieron resultados satisfactorios, pues el testigo de extracto de mazorca sin inocular produjo igual efecto que los extractos inoculados con las cepas, pues provocó marchitez de las plantitas. En el otro testigo de agua destilada las plantitas permanecieron sin ningún síntoma.

DISCUSION

Morfología

Las características generales de las colonias del hongo utilizadas en el presente estudio fueron similares a las señaladas por Hunt (16), quien no menciona la existencia de diferencias entre las cepas. Sin embargo en el presente trabajo se encontró que existe una gran variabilidad en el crecimiento.

Los resultados citados por otros investigadores (2, 6, 7, 9, 14, 16, 28) indican que hay una gran variación entre las cepas, pero en el presente estudio también la había dentro de las cepas cuando crecidas bajo condiciones iguales de temperatura y medio de cultivo. El hecho adicional de que todas las cepas usadas eran monospóricas indica que la variación posiblemente dependa de factores genéticos del hongo y no de los factores del medio ambiente.

Peritecios: Las características principales de los peritecios de las cepas estudiadas fueron iguales a las señaladas por Hunt (16). Las dimensiones del cuerpo tuvieron un mayor rango de variación que las encontradas por Castaño (6) y Pontis (28) para café, Chevaugéon (7) y Costa & Krug (9) para crotalaria, Hunt (16) en medio de laboratorio y Galli (14) en Crotalaria retusa y Cassia fistula. También se encontró un mayor rango de variación en el diámetro del cuello que el encontrado por Castaño (6) y Pontis (28) y el largo del cuello principalmente en las cepas de café mostró un mayor rango de variación. Además el largo promedio del cuello encontrado de 241 y 262 micrones, difiere del promedio encontrado por Castaño (6) que era de 500-600 micrones. Esta comparación muestra que el cuello corto encontrado en las cepas de café de Costa Rica no es un carácter típico de todas las cepas de café.

Endoconidias hialinas: El largo de las endoconidias hialinas está dentro de los límites de los rangos de 8-49 micrones citados por Arbelaez (2), Castaño (6), Chevaugéon (7), Galli (14), Hunt (16), y Pontis (28) y difiere de los encontrados por Costa & Krug (9) y Viegas (30) quienes encontraron rangos entre 35 y 108 micrones. El ancho obtenido para las endoconidias hialinas se halla dentro de los rangos señalados por los autores citados.

Endoconidias oscuras y ascosporas: Los valores obtenidos para la longitud y el ancho de las endoconidias oscuras y el largo de la base de las ascosporas indicaron estar de acuerdo con los informes de otros investigadores (6, 7, 9, 14, 16, 28, 30). Pero el alto de las mismas, no llegó a alcanzar las cifras citadas como valores máximos por estos autores.

Número de fimbrias: El número encontrado de fimbrias ostiolares generalmente estuvo dentro de los márgenes citados (7, 16). En las cepas de café se encontró peritecios que tenían 16 fimbrias, cifra que no difiere mayormente de los máximos de 14 y 15 encontrados por Chevaugéon (7) y Hunt (16) en C. fimbriata.

Patogenicidad

En las pruebas de patogenicidad con plantas jóvenes y adultas de cacao se encontró que C. fimbriata aislado de cacao y café podía atacar a cacao, confirmando los resultados de Malaguti (21). También se encontró que una cepa aislada de camote atacaba a cacao, hecho que no había sido señalado anteriormente.

Una cepa aislada de cacao fue patógena en café joven y adulto, concordando con un informe de Malaguti (22), pero en desacuerdo con Idrobo y Cardeñosa (17). Los resultados de la inoculación con la

cepa de camote en plantitas jóvenes de café se hallan de acuerdo con lo encontrado por Pontis (28) y Martin (24) quienes no observaron daños en la corteza. La patogenicidad de la cepa de camote California y de la cepa de cacao Ecuador Nº 1659 fue diferente en plantas jóvenes y plantas adultas de café; ninguna de las dos atacó a plantas jóvenes, mientras que ambas indujeron el cáncer típico en las plantas adultas. Esta diferencia pudiera deberse a un menor contenido de ácido clorogénico en las plantas adultas si se acepta la explicación propuesta recientemente por Echandi y Fernández (11).

Las cepas de cacao difirieron entre sí en patogenicidad en las pruebas en plantitas jóvenes de cacao, lo cual nunca había sido señalado. Cabe indicar que no existía relación entre el hábito de crecimiento y la morfología de las cepas con la patogenicidad de las mismas.

Ceratocystis moniliformis presentó también patogenicidad en cacao, lo que no se había informado anteriormente, y fue una de las menos patógenas en comparación con las otras cepas de C. fimbriata de cacao.

El hecho de que no se encontró diferencia de patogenicidad entre las cepas en plantas de cacao de más de 40 años de edad se debe a que el tiempo a transcurrir entre la inoculación y la aparición de los primeros síntomas es sin lugar a dudas mayor de dos meses; no fue posible por tanto observarlos en el momento de suspenderse la prueba.

Parece existir una cierta especificidad de las cepas aisladas de un hospedero para si mismo, pues tanto las de cacao, como las de café fueron más patógenas en cacao y café respectivamente. Esta especificidad no fue manifiestamente tan clara como para permitir distinguir las cepas, relacionándolas con su hospedero. No es posible por tanto, hablar de C. fimbriata f. coffeae, ni de C. fimbriata f. theobromae,

porque no son formas definidamente diferentes.

Se encontró que el tiempo a transcurrir desde la inoculación hasta la aparición de los primeros síntomas variaba considerablemente. Arbelaez (2) señala para cacao joven un intervalo de 7 días y para café 21 días. En el presente trabajo el intervalo variaba desde 10 días hasta dos meses en plantitas de cacao. Al terminar el experimento, todavía hubo algunas plantas severamente afectadas internamente, pero sin síntomas externos; hay razones para presuponer que estas plantitas hubieran muerto más tarde. En plantas adultas de cacao el intervalo fue no menor de dos meses, encontrándose que en 10 semanas después de la inoculación el patógeno había desarrollado en forma apreciable en algunos casos sin llegar a producir la muerte, mientras que en otros casos su desarrollo fue muy escaso. Esto indica que en condiciones de campo, el tiempo entre la infección y la aparición de los primeros síntomas por lo menos debe ser de tres meses y que con mucha probabilidad es más largo.

En café joven, tanto la cepa de cacao de Venezuela, como la de café de Costa Rica, San José, presentaron los primeros síntomas a las 6 semanas, tiempo mayor que el citado por Arbelaez (2), quien usó plantas de la misma edad. Esta diferencia podría deberse a una mayor patogenicidad de la cepa empleada, mejores condiciones ambientales para el desarrollo de la enfermedad o menor resistencia de las plantitas usadas en la prueba.

Los datos del segundo experimento con plantitas jóvenes de cacao muestran que hay una gran variabilidad de infección dentro de las parcelas de cacao joven inoculado. Tanto el intervalo de tiempo entre la inoculación y muerte, como el desarrollo del hongo en las plantas

sobrevivientes variaban apreciablemente. Es posible que esta variación se deba principalmente a diferencias genéticas de las plantitas. Es conocido que el cacao es una especie altamente heterocigota, lo cual puede explicar la variación en susceptibilidad aun en plantas de semilla de polinización abierta provenientes del mismo clon.

Toxicidad

La muerte de todas las plantas indicadoras en la primera prueba podría deberse a cierta toxicidad propia del medio, como lo demostró la acción tóxica del medio sin inocular.

La causa de la muerte de las plantas indicadoras en la prueba con extractos de cáscara de mazorca es de difícil explicación, pudiendo atribuirse a la presencia de sustancias tóxicas a las plantas indicadoras en las mazorcas, al taponamiento de los vasos conductores con el abundante mucílago de las cáscaras o a un pH. inadecuado.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones del presente trabajo son:

1. Parecen existir diferencias morfológicas en relación al tamaño de varios caracteres. entre las cepas aisladas, sin relación al hospedero original.
2. En cacao y en café la susceptibilidad depende de la cepa empleada para la inoculación; en café también influye la edad del hospedero, siendo las plantas adultas las más susceptibles.
3. Las pruebas de patogenicidad indican que existen diferencias entre las cepas de cacao en cuanto a poder patogénico en el mismo hospedero.
4. Las mismas pruebas indican que hay cierta especificidad de las cepas en el ataque al hospedero original, siendo esta insuficiente para establecer nuevas formas taxonómicas.
5. Parece no existir ninguna relación entre las características morfológicas y patogénicas de las cepas.
6. La cepa de C. moniliformis se comporta en relación a poder patogénico en cacao como una cepa de baja patogenicidad de C. fimbriata de cacao.
7. El intervalo entre la inoculación y la aparición de los primeros síntomas en plantas adultas de cacao en ningún caso es menor de dos meses, siendo posiblemente mucho mayor.
8. Las pruebas de toxicidad no dieron indicación clara de la presencia o ausencia de sustancias tóxicas, sugiriéndose por tanto que se hagan investigaciones más detalladas sobre este particular.

9. Se sugiere que se hagan estudios sobre la resistencia de los diferentes clones y cultivares de cacao y café, en los cuales sería conveniente probar la resistencia con una mezcla de cepas. También sería conveniente que se hagan estudios sobre los cambios de susceptibilidad presentados con la edad en café.

RESUMEN

Con el objeto de estudiar la morfología y la patogenicidad de varias cepas de Ceratocystis fimbriata Ell. & Halst., se hicieron estudios de aislamientos de este hongo de cacao, café y camote.

Se estudiaron los hábitos de crecimiento de 6 cepas monospóricas cultivadas en medio artificial y se tomaron medidas del peritecio, endoconidias hialinas y oscuras, ascosporas y se determinó el número de fimbrias ostiolares. Se encontró una amplia variación en las medidas entre las cepas y dentro de las cepas. No parecía existir ninguna relación entre el tipo de crecimiento de la cepa y la morfología de la misma.

Se realizaron pruebas en plantas jóvenes y adultas de cacao y café con cepas de los distintos hospederos. Las cepas de cacao, café, camote fueron patógenas para cacao joven y adulto y para café adulto. No eran patógenas en plantitas de café joven una cepa de cacao (Ecuador Nº 1659) y una de camote (California).

Se encontraron diferencias en grado de patogenicidad en cacao en pruebas con diferentes cepas de C. fimbriata aisladas del mismo hospedero. También se encontró que Ceratocystis moniliformis (Hedgc.) C. Moreau era patógeno a cacao, lo cual no había sido señalado antes.

No se encontró ninguna relación entre las características morfológicas y la patogenicidad, ni entre las características morfológicas y el hospedero original; pero parece existir una cierta especificidad patogénica de las cepas con su hospedero original.

El tiempo transcurrido entre la inoculación y la presencia de los primeros síntomas de la enfermedad varía desde los 7 a 30 días en cacao joven, necesitándose en cacao adulto por lo menos un período de

dos meses. En café joven y viejo el período para que aparezcan los síntomas fue de 6 semanas.

También se realizaron pruebas de toxicidad, con el fin de encontrar la posible producción de sustancias tóxicas por C. fimbriata, pero los resultados no fueron claros.

SUMMARY

Isolates of Ceratocystis fimbriata Ell. & Halst. from cacao, coffee and sweet potato were studied as to their morphological and pathogenic characters.

Six monosporic isolates were cultured in an artificial medium and observations and measurements were made on their general growth habit, of the size of the perithecia, the hyaline endoconidia, the dark endoconidia and the ascospores, and of the number of ostiolar hyphae. These observations revealed a considerable variation between and within isolates. There seems to be no relationship between growth characteristics and morphological measurements of the different isolates.

Tests for pathogenicity were carried out with the different isolates by means of inoculations made in young and mature cacao and in coffee plants. The cacao, coffee and sweet potato isolates were found to be pathogenic to young and mature cacao, as well as to mature coffee. With young coffee plants, one cacao isolate (Ecuador 1659) and one sweet potato isolate (California) proved to be non-pathogenic.

Differences of degree of pathogenicity were encountered between cacao isolates of C. fimbriata. Since Ceratocystis moniliformis (Hedgc.) C. Moreau apparently has never been tested on cacao, it was included in these tests. Its pathogenicity toward cacao was similar to that of a mildly-pathogenic cacao isolate of C. fimbriata.

No relationship was found between the morphological features and the pathogenic characteristics of the different isolates, nor did the morphological features of the isolates give any indication of the identity of their original host; but it seems that a certain specificity of pathogenicity of isolates exists for their original host.

The interval between the times of inoculation and of the appearance of the first disease symptoms varied between 7 and 30 days in young cacao, while the interval in mature cacao trees was at least two months. The corresponding interval in young and mature coffee was six weeks.

Two experiments were carried out to test the possible production of toxins by the fungus. For technical reason, these did not yield satisfactory results.

LITERATURA CITADA

1. ANDRUS, C. F. & HARTER, L. L. Morphology of reproduction in Ceratostomella fimbriata. Journal of Agricultural Research 46(12):1059-1078. 1933.
2. ARBELAEZ, E. La llaga macana del tronco del cacao. Acta Agronómica. Palmira, Colombia 7(1):71-103. 1957.
3. BAKSHI, B. K. Studies on four species of Ceratocystis with a discussion on fungi causing sap-stain in Britain. Kew, Surrey. The Commonwealth Mycological Institute. 1951. 16 p. (Mycological papers no. 35).
4. BESSEY, F. A. Morphology and taxonomy of fungi. Rev. ed. The Blakiston Co., 1952. pp. 197-301.
5. BIANCHINI, C. Síntomas, prevención y combate de las principales enfermedades del Café en Costa Rica. Suelo Tico 11(44):37-48. 1959.
6. CASTAÑO, J. J. La llaga macana o cáncer del tronco y de los tallos del cafeto. Chinchiná, Colombia. Centro Nacional de Investigaciones del Café 1(10):26. 1953.
7. CHEVAUGEON, J. Ceratocystis fimbriata Ellis et Halsted. Revue de Mycologie. Supplement Colonial (Paris) 22(2):45-60. 1957.
8. DIMOND, A. E. Symptoms of Dutch elm disease reproduced by toxins of Graphium ulmi in culture, Phytopathology 37(1):7. 1947.
9. COSTA, A. S. & KRUG, H. P. Eine durch Ceratostomella hervorgerufene Welkekrankheit der Crotalaria juncea in Brasilien. Phytopathologische Zeitschrift 8:507-513. 1935.
10. ECHANDI, R. & ECHANDI, E. Influencia de vitaminas y amino ácidos en el crecimiento y esporulación de Mycena citricolor, Phoma costarricensis, Cercospora coffeicola y Ceratostomella fimbriata. Revista de Biología Tropical (Costa Rica) 1:103-111. 1958.
11. ECHANDI, E. & FERNANDEZ, C. E. Relation between chlorogenic acid content and resistance to coffee canker incited by Ceratocystis fimbriata. Turrialba, Costa Rica. Inter-American Institute of Agricultural Sciences. 1961. 7 p. (Unpublished paper).
12. FEAZELL, G. D. & MARTIN, W. J. Studies on Ceratostomella fimbriata from sweet potato and sycamore. Phytopathology 40:787. 1950.

13. FELDMAN, A. W., CAROSELLI, N. E. & HOWARD, F. L. Physiology of toxin production by Ceratostomella ulmi. Phytopathology 40:341-354. 1950.
14. GALLI, F. Nota sobre a ocorrência de Ceratostomella fimbriata (Ell. & Halst) Elliot en Crotalaria retusa e Cassia fistula. Revista de Agricultura (Piracicaba, Brasil) 33(4):225-227. 1958.
15. HALSTED, B. D. & FAIRCHILD, D. G. Sweet potato black rot (Ceratocystis fimbriata Ell. & Halst). Journal of Mycology 7(1):1-11. 1891.
16. HUNT, J. Taxonomy of the genus Ceratocystis. Lloydia 19(1):1-58. 1956.
17. IDROBO, M. S. & CARDEÑOSA, B. R. Grave epítotia en Colombia causa el Ceratostomella fimbriata (Ell. & Halst) Elliot en cacao, Theobroma cacao L. Cacao en Colombia 5:25-27. 1956.
18. LEONIAN, L. H. & LILLY, V. G. Studies on the nutrition of fungi. Phytopathology 28:531-548. 1958.
19. LILLY, V. G. & BARNETT, H. L. Physiology of fungi. New York, McGraw Hill Book Co. 1951. pp. 378-379.
20. MALAGUTI, G. Ceratostomella fimbriata en el cacao de Venezuela. Acta Científica Venezolana 3(3):94-97. 1952.
21. _____ La necrosis del tronco del cacao en Venezuela. Agronomía Tropical (Venezuela) 5(4):207-226. 1956.
22. _____ Una podredumbre del tallo de Crotalaria juncea, causada por Ceratostomella fimbriata. Agronomía Tropical (Venezuela) 1(4):287-292. 1952.
23. MARTIN, W. J. Coffee and sweet potato strains of Ceratostomella fimbriata. Association of Southern Agricultural Workers. Proceedings 46:127. 1949.
24. _____ Moldy rot of tapping panels of Hevea rubber trees. U. S. Department of Agriculture. Circular 798. 1949. 23 p.
25. MIZUKANI, T. Comparison of the pathogenicity of Ceratostomella fimbriata and Endoconidiophora spp. causal fungus of Taro black rot on sweet potatoes and Taroes. Sci. Bull. Fac. Agr. Kyushu Univ. 12:1. 1950. (Original no disponible, Abstract in Review of Applied Mycology 31(6):294. 1952).
26. NAUNDORF, G. & IDROBO, S. Producción de toxinas por el Ceratostomella fimbriata en cacao. Cacao en Colombia 5:37-39. 1956.

27. OLSON, E. O. Genetics of Ceratostomella I. Strains in Ceratostomella fimbriata (Ell. & Halst.) Elliot from sweet potatoes. *Phytopathology* 39(7):548-561. 1949.
28. PONTIS, R. E. A canker disease of the coffee tree in Colombia and Venezuela. *Phytopathology* 41:178-184. 1951.
29. ROBINS, W. J. & MA, ROBERTA. Vitamin deficiencies of Ceratostomella and related fungi. *American Journal of Botany* 29:835-843. 1942.
30. VIEGAS, A. P. Seca da Mangeira. *Bragantia* 19(11):163-182. 1960.
31. ZENTMAYER, G. A. Toxin formation and chemotherapy in relation to Dutch elm disease. *Phytopathology* 32:20. 1942.
32. _____ & HORSFALL, J. G. Toxin formation by Ceratostomella ulmi. *Science* 95:512-513. 1942.

APENDICE

CUADRO 1. Análisis de la variancia del diámetro vertical del cuerpo del peritecio de 6 cepas de C. fimbriata: Cacao Colombia Nº 1, Cacao Ecuador Nº 1659, Cacao Venezuela Nº 560, Café Costa Rica, San José, Café Costa Rica, Aquiares y Camote Estados Unidos de Norte América, California.

F. de V.	G. L.	S. C.	C. M.	F.
Cepas	5	1,590,38	318.07	22.04 ^{**}
Cacao vs Café + Camote	1	238,14	238.14	16.50 ^{**}
Entre Cacao	2	569.31	284.65	19.73 ^{**}
Entre Café	1	5.45	5.45	0.38
Café vs Camote	1	777.48	777.48	53.89 ^{**}
Error	594	8,569.60	14.43	
Total	599	10,159.98		

** Significativo al 1%

CUADRO 2. Análisis de la variancia del diámetro horizontal del cuerpo del peritecio de 6 cepas de C. fimbriata: Cacao Colombia Nº 1, Cacao Ecuador Nº 1659, Cacao Venezuela Nº 560, Café Costa Rica, San José, Café Costa Rica, Aquiares y Camote Estados Unidos de Norte América, California.

F. de V.	G. L.	S. C.	C. M.	F.
Cepas	5	2,514.90	502.98	36.46 ^{**}
Cacao vs Café + Camote	1	31.28	31.28	2.26
Entre Cacao	2	834.69	417.34	30.26 ^{**}
Entre Café	1	8.82	8.82	0.64
Café vs Camote	1	1,640.11	1,640.11	118.90 ^{**}
Error	594	8,193.57	13.79	
Total	599	10,708.47		

** Significativo al 1%

CUADRO 3. Análisis de la variancia del largo del cuello del peritecio de 6 cepas de C. fimbriata: Cacao Colombia Nº 1, Cacao Ecuador Nº 1659, Cacao Venezuela Nº 560, Café Costa Rica, San José, Café Costa Rica, Aquiares y Camote, USA California.

F. de V.	G. L.	S. C.	C. M.	F.
Cepas	5	60,863.42	12,172.68	94.86 ^{**}
Cacao vs Café + Camote	1	27,418.56	27,418.56	213.67 ^{**}
Entre Cacao	2	3,613.93	1,806.96	14.08 ^{**}
Entre Café	1	108.05	108.05	0.84
Café vs Camote	1	29,722.88	29,722.88	231.63 ^{**}
Error	594	128.32		
Total	599	137.083.84		

^{**} Significativo al 1%

CUADRO 4. Análisis de la variancia del diámetro de la base del cuello de 6 cepas de C. fimbriata: Cacao Colombia Nº 1, Cacao Ecuador Nº 1659, Cacao Venezuela Nº 560, Café Costa Rica, San José, Café Costa Rica, Aquiares y Camote USA California.

F. de V.	G. L.	S. C.	C. M.	F.
Cepas	5	19.28	3.85	128.33 ^{**}
Cacao vs Café + Camote	1	1.70	1.70	56.6 ^{**}
Entre Cacao	2	6.05	3.02	100.06 ^{**}
Entre Café	1	0.05	0.05	1.66 ^{**}
Café vs Camote	1	11.48	11.48	382.66 ^{**}
Error	594	21.48	0.03	
Total	599	40.76		

^{**} Significativo al 1%

CUADRO 5. Análisis de la variancia del diámetro de la punta del cuello del peritecio de 6 cepas de *C. fimbriata*: Cacao Colombia Nº 1, Cacao Ecuador Nº 1659, Cacao Venezuela Nº 560, Café Costa Rica, San José, Café Costa Rica, Aquiares y Camote USA California.

F. de V.	G. L.	S. C.	C. M.	F.
Cepas	5	36.02	7.20	45.00 ^{**}
Cacao vs Café + Camote	1	19.44	19.44	121.50 ^{**}
Entre Cacao	2	2.45	1.22	7.62 ^{**}
Entre Café	1	2.65	2.65	16.56 ^{**}
Café vs Camote	1	11.48	11.48	71.75 ^{**}
Error	594	99.96	0.16	
Total	599	135.98		

^{**} Significativo al 1%

CUADRO 6. Análisis de la variancia del número de fimbrias ostiolares del peritecio de 5 cepas de *C. fimbriata*: Cacao Ecuador Nº 1659, Cacao Venezuela Nº 560, Café Costa Rica, San José, Café Costa Rica, Aquiares y Camote USA California.

F. de V.	G. L.	S. C.	C. M.	F.
Cepas	4	59.06	14.76	6.07 ^{**}
Cacao vs Café + Camote	1	5.72	5.72	2.35
Entre Cacao	1	7.61	7.61	3.13
Entre Café	1	7.22	7.22	2.97
Café vs Camote	1	38.51	38.51	15.84 ^{**}
Error	495	1,212.85	2.43	
Total	499	1,271.91		

^{**} Significativo al 1%

CUADRO 7. Análisis de la variancia del largo de las endoconidias hialinas de 6 cepas de C. fimbriata: Cacao Colombia N^o 1, Cacao Ecuador N^o 1659, Cacao Venezuela N^o 560, Café Costa Rica, San José, Café Costa Rica, Aquiares y Camote USA California.

F. de V.	G. L.	S. C.	C. M.	F.
Cepas	5	127.07	25.41	7.68 ^{**}
Cacao vs Café + Camote	1	0.04	0.04	0.01
Entre Cacao	2	80.41	40.20	12.14 ^{**}
Entre Café	1	2.88	2.88	0.87
Café vs Camote	1	43.74	43.74	13.21 ^{**}
Error	594	1,697.73	3.31	
Total	599	2,094.80		

** Significativo al 1%

CUADRO 8. Análisis de la variancia del ancho de las endoconidias hialinas de 6 cepas de C. fimbriata: Cacao Colombia N^o 1, Cacao Ecuador N^o 1659, Cacao Venezuela N^o 560, Café Costa Rica, San José, Café Costa Rica, Aquiares y Camote USA California.

F. de V.	G. L.	S. C.	C. M.	F.
Cepas	5	4.91	0.98	3.71 ^{**}
Cacao vs Café + Camote	1	1.21	1.21	4.58 ^{**}
Entre Cacao	2	1.21	0.605	2.29
Entre Café	1	1.45	1.45	5.49 ^{**}
Café vs Camote	1	1.04	1.04	0.39
Error	594	157.09	0.26	
Total	599	162.00		

** Significativo al 1%

CUADRO 9. Análisis de la variancia del largo de las endoconidias oscuras de 6 cepas de C. fimbriata: Cacao Colombia Nº 1, Cacao Ecuador Nº 1659, Cacao Venezuela Nº 560, Café Costa Rica, San José, Café Costa Rica, Aquiares y Camote USA California.

F. de V.	G. L.	S. C.	C. M.	F.
Cepas	5	1.09	0.218	0.598
Error	594	216.23	0.364	
Total	599	217.32		

CUADRO 10. Análisis de la variancia del ancho de las endoconidias oscuras de 6 cepas de C. fimbriata: Cacao Colombia Nº 1, Cacao Ecuador Nº 1659, Cacao Venezuela Nº 560, Café Costa Rica, San José, Café Costa Rica, Aquiares y Camote USA California.

F. de V.	G. L.	S. C.	C. M.	F.
Cepas	5	17.10	3.42	17.27 ^{**}
Cacao vs Café + Camote	1	6.41	6.41	32.37 ^{**}
Entre Cacao	2	5.46	2.73	3.86 ^{**}
Entre Café	1	2.00	2.00	10.10 ^{**}
Café vs Camote	1	3.23	3.23	16.31 ^{**}
Error	594	118.00	0.198	
Total	599	135.10		

** Significativo al 1%

CUADRO 11. Análisis de la variancia del ancho de las ascosporas de 6 cepas de C. fimbriata: Cacao Colombia Nº 1, Cacao Ecuador Nº 1659, Cacao Venezuela Nº 560, Café Costa Rica, San José, Café Costa Rica, Quijames y Camote USA California.

F. de V.	G. L.	S. C.	C. M.	F.
Cepas	5	5.41	1.08	7.71 ^{**}
Cacao vs Café + Camote	1	1.81	1.81	12.92 ^{**}
Entre Cacao	2	2.99	1.49	10.64 ^{**}
Entre Café	1	0.01	0.01	10.07
Café vs Camote	1	0.60	0.60	4.28 ^{**}
Error	594	82.51	0.14	
Total	599	87.92		

** Significativo al 1%

CUADRO 12. Prueba en cacao adulto. Valores de infección obtenidos de acuerdo a una escala dada^{*}.

Repeticiones	Tratamientos ^{**}			Total
	1	2	3	
I	32	28	37	97
II	28	25	33	86
III	35	30	38	103
IV	32	26	31	89
V	34	26	34	94
VI	29	29	33	91
VII	35	29	38	102
VIII	35	26	34	95
Total	260	219	278	757

* La escala usada fue:

- (1) planta sana, con la herida completamente cicatrizada
- (2) planta enferma con un desarrollo hasta 10 cm. de infección
- (3) planta enferma con más de 10 cm. de infección, y
- (4) planta muerta.

- ** 1 = Cacao Ecuador Nº 1659
2 = Café Costa Rica, San José
3 = Camote USA California

CUADRO 13. Análisis de la variancia de la prueba en cacao adulto.

F. de V.	G. L.	S. C.	C. M.	F.
Cepas	2	228.58	114.29	38.09 ^{**}
Repeticiones	7	83.29	11.89	3.96 [*]
Error	14	42.09	3.00	
Total	23	353.96		

^{**} Significativo al 1%

^{*} Significativo al 5%

CUADRO 14. Prueba en café adulto. Valores de infección obtenidos de acuerdo a una escala dada^{*}.

Repeticiones	Tratamientos ^{**}			Total
	1	2	3	
I	23	23	20	66
II	23	26	19	68
III	24	32	29	85
IV	22	27	20	69
V	22	27	24	73
VI	25	26	25	76
VII	20	28	21	69
VIII	24	30	23	77
Total	183	219	181	583

^{*} La escala usada fue:

- (1) planta sana, con la herida completamente cicatrizada
- (2) planta enferma con un desarrollo de hasta 10 cm. de infección
- (3) planta enferma, con más de 10 cm. de infección, y
- (4) planta muerta

^{**} 1 = Cacao Ecuador Nº 1659
 2 = Café Costa Rica, San José
 3 = Camote USA California

CUADRO 15. Análisis de la variancia de la prueba en café adulto.

F. de V.	G. L.	S. C.	C. M.	F.
Cepas	2	114.33	57.16	18.99 ^{xx}
Repeticiones	7	104.49	14.92	4.95 ^{xx}
Error	14	42.14	3.01	
Total	23	260.96		

xx Significativo al 1%

CUADRO 16. Prueba de infección en plantitas jóvenes de cacao y café. Datos obtenidos mediante una escala^x.

Repeticiones	Tratamientos ^{xx}										Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
I	24	12	23	19	21	23	19	12	12	12	177
II	24	12	21	19	23	21	24	12	12	12	180
III	23	12	21	22	12	21	12	12	12	12	159
IV	23	12	22	21	20	21	22	12	12	12	177
V	23	12	23	19	23	23	21	12	12	12	180
VI	24	12	23	19	22	21	17	12	12	12	174
VII	24	12	23	15	15	19	14	12	12	12	158
VIII	23	12	23	18	16	19	16	12	12	12	163
Total	188	96	179	152	152	168	145	96	96	96	1368

x Escala usada

- (1) planta sana
- (2) planta muerta por la infección

- xx 1 = Cacao Ecuador N° 1659 en cacao
- 2 = Cacao Ecuador N° 1659 en café
- 3 = Cacao Venezuela N° 560 en cacao
- 4 = Cacao Venezuela N° 560 en café
- 5 = Café Costa Rica, San José en cacao
- 6 = Café Costa Rica, San José en café
- 7 = Camote Estados Unidos de Norte América en cacao
- 8 = Camote Estados Unidos de Norte América en café
- 9 = Agua destilada en cacao (testigo)
- 10 = Agua destilada en café (testigo)

CUADRO 17. Análisis de la variancia de la prueba en plantitas jóvenes de cacao y café.

F. de V.	G. L.	S. C.	C. M.	F.
Repeticiones	7	62.00	8.86	6.42 ^{**}
Cepa Camote vs Cepas Café + Cacao	1	234.08	234.08	169.62 ^{**}
Cepa Café vs Cepa Cacao	1	6.51	6.51	4.72 [*]
Cepa Cacao Ecuador vs Cepa Cacao Venezuela	1	69.03	69.03	50.02 ^{**}
Entre Hospederos	1	361.00	361.00	261.59 ^{**}
Testigos vs Cepas	1	520.20	520.20	376.96 ^{**}
Cepas vs Hospederos	3	379.63	126.54	91.70 ^{**}
Testigos	1	0.00	0.00	
Error	63	86.75	1.38	
Total	79	1,719.20		

** Significativo al 1%

* Significativo al 5%

CUADRO 18. Prueba en árboles de cacao de más de 40 años. Superficie infectada en cm², a los dos meses, con 6 cepas de C. fimbriata aisladas de cacao.

Repeticiones	Tratamientos						Total
	Colombia Nº 1	Colombia Nº 2	Ecuador Nº 1658	Ecuador Nº 1659	Venezuela Nº 556	Venezuela Nº 560	
I	12.75	53.00	37.05	24.00	26.08	33.23	186.11
II	35.00	25.50	31.98	72.91	25.58	39.79	230.76
III	38.25	14.00	29.80	52.67	71.00	49.00	254.72
IV	36.75	30.75	69.99	34.86	32.75	23.84	228.94
V	61.00	22.00	22.01	45.90	27.77	17.98	196.66
VI	32.25	40.00	42.25	46.12	30.11	13.13	203.86
VII	22.00	64.35	21.98	64.91	24.47	26.44	224.15
VIII	70.00	70.20	31.67	45.99	40.65	41.00	299.51
IX	26.50	57.75	43.02	28.86	16.91	38.37	211.41
X	15.25	36.50	30.70	20.50	23.74	39.79	166.48
XI	16.75	34.50	26.15	38.99	33.16	35.98	185.53
XII	21.25	38.25	141.09	14.70	58.75	27.69	301.73
Total	387.75	486.80	527.69	490.41	410.97	386.24	2689.86

CUADRO 19. Análisis de la variancia, de la prueba con árboles de cacao de más de 40 años.

F. de V.	G. L.	S. C.	C. M.	F.
Cepas	5	1,539.129	307.826	0.740
Repeticiones	11	3,382.169	370.470	0.891
Error	55	22,856.495	415.573	
Total	71	27,777.793		

CUADRO 20. Prueba en plantitas jóvenes de cacao. Datos obtenidos mediante el uso de una escala^x.

Repeticiones	Tratamientos ^{xx}										Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
I	16	20	18	19	14	19	18	15	12	10	161
II	13	19	18	19	12	19	17	13	14	10	154
III	12	19	17	16	15	19	16	13	15	10	152
IV	17	18	16	10	12	16	16	12	13	10	140
V	17	19	17	19	16	18	17	12	16	10	161
Total	75	95	86	83	69	91	84	65	70	50	768

^x Escala usada

- (1) planta sana
- (2) planta muerta

- ^{xx} 1 = Cacao Colombia N° 1
 2 = Cacao Colombia N° 2
 3 = Cacao Costa Rica, Mazorca
 4 = Cacao Costa Rica, tronco
 5 = C. moniliformis (Costa Rica)
 6 = Cacao Ecuador N° 1658
 7 = Cacao Ecuador N° 1659
 8 = Cacao Venezuela N° 556
 9 = Cacao Venezuela N° 560
 10 = Testigo, agua destilada

CUADRO 21. Análisis de la variancia de la prueba con plantitas jóvenes de cacao, con 8 cepas de C. fimbriata, 1 cepa de C. moniliformis y como testigo agua destilada.

F. de V.	G. L.	S. C.	C. M.	F.
Cepas	9	335.12	37.24	133.89 ^{**}
Repeticiones	4	29.72	7.43	2.77 [*]
Error	36	96.68	2.68	
Total	49	461.52		

** Significativo al 1%

* Significativo al 5%